

核桃叶抑菌成分的提取及其抑菌活性

翟梅枝^{1,2}, 李晓明³, 林奇英¹, 谢联辉¹

(1. 福建农林大学 植物病毒所, 福建 福州 350002; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100;

3. 西北农林科技大学 资源与环境学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:对核桃叶乙醇提取物和其不同溶剂萃取部分及层析组分进行抑菌试验, 结果显示: 乙醇提取物和乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌和黑根霉有较强的抑制作用。且乙醇提取物的抑菌作用随浓度增大而增强。不同浓度处理时, 提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和黑根霉的抑菌作用均达差异极显著水平, 对蜡状芽孢杆菌的抑菌作用差异显著。结果还显示: 同一浓度提取物对不同细菌的抑菌作用亦不同。

关键词:核桃叶; 提取物; 抑菌活性

中图分类号:S792.130.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2003)04-0089-03

Extract of Inhibiting Composition and Inhibitory Activity from Walnut Leaves

ZHAI Mei-zhi^{1,2}, LI Xiao-ming³, LIN Qi-ying¹, XIE Lian-hui¹

(1. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. College of Forestry, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China;

3. College of Resources and Environment, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The six different extracts from the walnut leaves were tested for antibacterial and antifungal activity. The results showed that the extract of alcohol and acetic ester had the remarkable bacteriostasis against the four bacteria and fungus (*Rhizopus* sp.) tested, and the higher the concentration, the larger the bacteriostasis was. The bacteriostasis treated with the different concentration of the alcohol extract was different significantly against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Rhizopus* sp.. The results also showed that the bacteriostasis of the different bacterias was different with the same concentration.

Key words: walnut leaves; extract; inhibitory activity

随着生活水平和文化素养的提高, 人们的保健意识逐渐增强, 对天然无公害、无污染产品的需求越来越多, 为了满足这种需要, 国内外学者对天然产物提取成分在抗菌、抑菌方面作了许多工作^[1-3], 从资源丰富的植物中寻找高效、低毒的杀菌、抑菌成分, 并由此开发无公害植物源杀菌剂, 已成为该研究领域

的方向和热点。核桃(*Juglans regia* L.)是我国分布较广的重要树种, 其青果皮、枝条可药用, 具有杀菌、消炎、抗癌等作用^[4,5]。据分析, 核桃叶内含有胡桃醌、胡桃甙、柠檬烯、没食子酸及油酸等多种生物化学成分^[6], 核桃叶提取物的杀虫活性^[7]和抗油脂氧化作

用^[8]已有报道。为了更全面地了解核桃叶提取物的多方面活性, 笔者对其进行了抑菌试验研究, 希望从中寻找到抗菌活性物质, 为核桃叶资源的多途径开发找到新的出路。

1 材料和方法

1.1 材料

供试细菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*); 大肠杆菌(*Escherichia coli*.)。

供试真菌: 青霉(*Penicillium* sp.); 毛霉(*Mucor* sp.); 黑根霉(*Rhizopus* sp.)。

收稿日期: 2003-02-24

基金项目: 福建省科技厅重点项目(99-Z-193)

作者简介: 翟梅枝(1963-), 女, 河南西平人, 副教授, 在读博士生。研究方向: 植物病理学; 林奇英为通讯作者。

供试菌种均由西北农林科技大学资源与环境学院微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 待测样品的制备 以 70% 乙醇为提取溶剂,回流提取 3 次(5 h→3 h→2 h),合并提取液减压浓缩至浸膏状,留少部分醇提物稀释后直接用于抑菌试验;剩余部分依次用乙醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,各萃取液回收溶剂后得相应萃取物及萃余水相。取一定量的乙酸乙酯萃取物进行聚酰胺柱层析,水洗脱后,直接以 95% 乙醇洗脱,收集醇洗脱液并浓缩至干,得总黄酮组分。

供抑菌试验的待测样品见表 1。

表 1 待测样品及编号

Table 1 The number and tested samples

编号	待测样品
A	核桃叶 70% 乙醇提取物
A-1	A 样乙醚萃取物
A-2	A 样乙酸乙酯萃取物
A-3	A 样正丁醇萃取物
A-4	A 样萃余水相
B	总黄酮组分

注:1) A 样品测试 4 个浓度,以无菌水稀释至 100, 50, 25, 12.5 mg/mL,以无菌水作对照;2) B 样及各萃取物样品以二甲亚砜助溶(A-1 除外),测试浓度 25 mg/mL,以二甲亚砜作对照。

万方数据

1.2.2 菌悬液的制备 欲先将供试菌种用适宜的培养基进行活化,量取 10 mL 无菌水于试管中,然后用接种环磨擦培养基表面,取出接种环,将菌苔放入无菌水中,充分振荡摇匀,得菌悬液。

1.2.3 抑菌实验 采用滤纸片法,将已灭菌培养基(细菌培养用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,真菌培养用马铃薯琼脂培养基)冷却至 45~50℃,在无菌条件下,将其倒入培养皿中,每皿 10 mL 左右,冷却后每皿加入菌悬液 1 mL,用刮铲涂抹均匀,然后取灭菌的圆片滤纸($d=13$ mm),分别浸渍提取液 30 s 后取出,滤干药液后贴于琼脂平板上,每皿放置 3 片,各纸片间的距离均等,每一样品重复 3 次,将细菌置 28℃ 恒温箱中培养 24 h,真菌置 28℃ 培养 72 h,用十字交叉法测量抑菌圈直径,取其平均值作为试验结果。

2 结果与分析

2.1 核桃叶不同提取物抑菌活性比较

由表 2 的抑菌结果可以看出:(1)6 个提取物样品中 A 和 A-2 对供试菌种中的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌和黑根霉 5 个菌种有较强的抑制作用,而 A-1、A-3 和 B 三个

表 2 核桃叶提取物抑菌结果

Table 2 Bacteriostasis results of the walnut leaves extract

样品编号	S. a	B. s	B. c	E. c	P. sp	Mu. sp	Ph. sp
A	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
A-1	++	+	++	++	-	-	+
A-2	+++	+++	+++	++	-	-	+++
A-3	++	+	++	+	-	-	++
A-4	+	-	+	-	-	-	-
B	+++	+	++	++	-	-	++

注:1) -:无抑菌;+: $d<15.0$ mm; ++: $d=15.0-20.0$ mm; +++: $d>20.00$ mm。2) S. a 金黄色葡萄球菌; B. s 枯草芽孢杆菌; B. c 蜡状芽孢杆菌; E. c 大肠杆菌; P. sp 青霉; Mu. sp 毛霉; Ph. sp 黑根霉。3) A 样的药液浓度 100 mg/mL,其它样品的药液浓度 25 mg/mL。

样品对 4 种细菌和真菌中的黑根霉有不同程度的抑菌作用。说明核桃叶 70% 乙醇提取物和其乙酸乙酯萃取物含有活性较高的抑菌成分。(2) A-4 样除对金黄色葡萄球菌和蜡状芽孢杆菌有微弱的抑菌作用外,对其它 5 个供试菌无抑菌作用。这说明 70% 乙醇提取物经乙醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取后,剩余水相中抑菌活性成分含量已相对较少,因而表现出较弱的抑菌作用或无作用。(3) 6 个样品对供试真菌中的青霉和毛霉均无抑制作用。(4) A-2 样经柱层析得到的黄酮组分(B),其抑菌作用从总体上看较强,但不如 A-2。可能因 A-2 中的抗菌活性物质种类多,成分间有协同增效作用所致。

2.2 不同浓度的醇提物对细菌的抑菌效果

以醇提物的不同浓度进行抑菌活性试验,由表 3 可看出:(1)同一浓度醇提物对不同细菌的抑制作

表 3 不同浓度醇提物的抑菌效果

Table 3 Bacteriostasis effect of the different concentration extract

处理	B. s	S. a	B. c	E. c	Ph. sp
A ₁	25.10	25.57	23.57	21.83	26.80
A ₂	23.17	24.40	22.50	17.93	24.47
A ₃	19.30	20.00	21.55	—	19.20
A ₄	19.03	19.00	17.27	—	16.30

*: A₁ - A₄ 各处理浓度(mg. ml⁻¹)为:100, 50, 25, 12.5

用不同。A₁ 和 A₂ 两处理对 4 种细菌的抑制作用顺序一致。即:金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>蜡状芽孢杆菌>大肠杆菌;A₃ 和 A₄ 对大肠杆菌均无抑菌作用,但对其它 3 种细菌的抑菌作用大小顺序恰好相反,A₃ 处理为:蜡状芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌;A₄ 处理为:枯草芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>蜡状芽孢杆菌。对不同浓度、不同菌种抑菌效果进行方差分析后得知: $F_{41}=15.83^{**}$, $F_{42}=9.44^{**}$, $F_{43}=2.04$, $F_{44}=1.34$, 而 $F_{0.01}=8.02$, $F_{0.05}=5.14$ 。说明了 A₁、A₂ 两处理对菌种

间抑菌效果的影响达到极显著水平; A_3 、 A_4 两处理对菌种间抑菌效果的影响无显著差异。

(2) 不同浓度醇提物对同种细菌的抑制作用大小为: $A_1 > A_2 > A_3 > A_4$, 均呈现浓度越大, 抑菌作用越强的趋势。对各菌种不同浓度处理后, 抑菌效果进行方差分析, 结果表明: 1) $F_{\text{枯}} = 13.55^{**} > F_{0.01}(8.02)$; $F_{\text{金}} = 29.48^{**} > F_{0.01}(8.02)$; $F_{\text{蜡}} = 7.72^{*} > F_{0.05}(4.26)$ 。即不同浓度提取物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌作用存在极显著差异; 对蜡状芽孢杆菌的抑菌作用差异显著。

2.3 不同浓度的醇提物对真菌(黑霉)的抑菌效果

从表3直观分析可知: 随着浓度的增大, 提取物对黑霉的抑菌作用逐渐增强。对不同浓度提取物的抑菌效果进行方差分析后知: $F = 98.68^{**} > F_{0.01}(8.02)$, 由此说明不同浓度处理对黑根霉抑菌效果存在极显著差异。多重比较显示: A_1 、 A_2 、 A_3 与 A_4 处理间抑菌效果均达到极显著水平; A_1 与 A_3 处理间抑菌效果存在显著差异, 其它处理间差异不显著。 A_1 、 A_2 两处理对菌种间抑菌效果的影响达到极显著水平。

3 结论 万方数据

6种核桃叶提取物样品中乙醇提取物和乙酸乙酯萃取物对供试的4种细菌和黑根霉(真菌)有较强的抑制作用; 乙醚萃取物、正丁醇萃取物和黄酮组分对这5种菌有不同程度的抑制作用; 萃取水相仅对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌有微弱抑菌作用,

对其它供试菌无作用。

核桃叶醇提物对供试细菌和黑根霉(真菌)的抑菌作用随浓度增大而增强。不同浓度处理对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和黑根霉的抑菌作用达差异极显著水平, 对蜡状芽孢杆菌的抑菌作用差异显著; 同一浓度处理对不同细菌的抑菌作用亦不同, A_1 、 A_2 两处理对菌种间抑菌效果的影响达到极显著水平; A_3 与 A_4 两处理则无显著差异。

由此可见, 核桃叶提取物具有较好的抑菌活性, 开发利用前景广阔。活性成分的确定和分离筛选工作正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 马慕英. 灵芝抑菌作用的实验研究[J]. 食品科学, 1993, 14(5): 58-59.
- [2] 张伟, 檀建民. 竹叶对食品致病菌的抑菌作用[J]. 食品科学, 1998, 19(4): ?.
- [3] 马小军, 赵玲, 杜程芳, 等. 滇白珠提取物抗细菌活性的筛选[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(4): 223-226.
- [4] 张野平, 杨志博. 胡桃醌抗肿瘤作用的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1987, 4(3): 166-169.
- [5] 张野平, 杨志博. 胡桃醌对肿瘤细胞的增殖抑制作用和抗菌作用[J]. 沈阳药学院学报, 1993, 10(4): 271-274.
- [6] 郑荣庭, 张毅萍. 中国果树志·核桃卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [7] 翟梅枝, 杨秀萍, 刘路. 核桃叶提取物对蚜虫的触杀作用[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(4): 55-56.
- [8] 尉芹, 马希汉, 韩学文, 等. 核桃叶抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(7): 81-83.

(上接第80页)

- [2] 陈川, 唐周怀, 石晓红, 等. 生草苹果园主要害虫和天敌的生态位研究[J]. 西北农业学报, 2002, 11(3): 78-82.
- [3] 西北农学院植保系, 陕西省动物研究所. 陕西省经济昆虫图志, 鞘翅目: 瓢虫[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985.
- [4] 杨之为, 汪世泽, 李岗. 农业试验统计及病虫测报——计算机

可编程序集[M]. 陕西 杨陵: 天则出版社, 1990.

- [5] 王东昌, 袁忠林, 罗兰, 等. 异色瓢虫对桃大蚜的捕食作用研究[J]. 植物保护, 2001, 27(1): 29-31.
- [6] 朱承美, 曲爱军, 邵小杰, 等. 异色瓢虫显明变种在桃树上发生规律及对桃粉蚜捕食作用的研究[J]. 落叶果树, 1996, (4): 14-17.